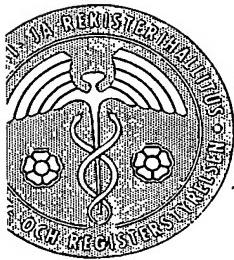


Helsinki 9.2.2004

E T U O I K E U S T O D I S T U S
P R I O R I T Y D O C U M E N T

RECEIVED	
01 MAR 2004	
WIPO	PCT



Hakija Applicant	Mobidiag Oy Helsinki
Patentihakemus nro Patent application no	20022064
Tekemispäivä Filing date	19.11.2002
Kansainvälinen luokka International class	C12Q
Keksinnön nimitys Title of invention	"Nukleinihappokoettimia, universaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksistä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims, abstract and drawings originally filed with the Finnish Patent Office.

Markkula Tehikoski
Markkula Tehikoski
Apulaistarkastaja

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

*Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001
Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.*

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500 Telefax: 09 6939 5328
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500 Telefax: + 358 9 6939 5328
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

BEST AVAILABLE COPY

Nukleiinihappokoettimia, universaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään

Keksinnönala

Keksintö koskee nukleiinihappokoettimia ja universaleja alukkeita, jotka ovat käyttökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnostoimisessa. Erityisesti eksintö koskee spesifisiä nukleiinihappokoettimia, jotka ovat peräisin infekcioita aiheuttavien bakteerien topoisomeraasigeenin konservoituneiden alueiden lähellä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaleja alukkeita, jotka ovat peräisin topoisomeraasigeenin konservoituneilta alueilta. Lisäksi eksintö koskee näiden nukleiinihappokoettimiien ja universalien alukkeiden käyttöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnostiassa sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinihappokoettimia ja universaleja alukkeita.

Keksinnöntausta

Hengitystieinfektiot ovat yleisin syy lääkärin vastaanotolla käyntiin. Suomessa todetaan vuosittain noin 13 keuhkokuumetapausta 1 000 asukasta kohden ja aikuutteja poskiontelo- ja korvatulehduksia diagnostoidaan vielä huomattavasti enemmän. Esimerkiksi korvatulehduksia todetaan Suomessa vuodessa arviolta noin 200 000 tapausta (pääasiassa lapsilla). Hengitystieinfektiot kuormittavat terveydenhuoltoa ja aiheuttavat yhteiskunnalle mittavat kustannukset, joiden tarkempi laskeminen on vaikeaa, sillä suurin osa kustannuksista koostuu ns. epäsuorista kustannuksista, kuten työstä poissaolosta [Rautakorpi ym., Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 33(12): 920 - 926, 2001; Infektiotaudit, toim. Eskola, Huovinen ja Valtonen 1998]. Maailmanlaajuisesti hengitystieinfektiot aiheuttavat vuosittain useiden miljoonien ihmisten, pääasiassa lasten, kuoleman.

Hengitystieinfektiota aiheuttaa virusten lisäksi suuri joukko erilaisia bakteereja. *Streptococcus pyogenes* (A-ryhmän streptokokki) on tärkeä nielurisatulehduksen, tonsilliitin, aiheuttaja. Sen aiheuttamaan hoitamattomaan tonsilliittiin liittyy vakavien komplikaatioiden, kuten peritonsillaarisen absessin, risiki. Lisäksi *S. pyogenes* tonsilliittien jälktauteina voi esiintyä reumakuumetta ja glomerulonefriittiä, jotka molemmat ovat vakavia, jopa potilaan henkeä uhkaavia tauteja. Avohoitona keuhkokuumien tärkeimpiä taudinaiheuttajia ovat virusien lisäksi *Streptococcus pneumoniae* (pneumokokki), *Mycoplasma pneumoniae* ja *Chlamydia pneumoniae*, joista pneumokokki on yleisin ja vakavin

keuhkokuumeen aiheuttaja. Harvinaisempia keuhkokuumetta aiheuttavia bakteereja ovat *Legionella pneumophila* ja *Coxiella burnetii*. *Mycobacterium tuberculosis*-bakteeri puolestaan aiheuttaa keuhkotuberkuulosia. Immuunivajavaisilla potilailla todetaan lisäksi harvinaisten *Mycobacterium*- ja *Nocardia*-suvun

- 5 bakteerien aiheuttamia keuhkotulehduksia. Poskiontelotulehduksen (sinuitti) ja välikorvatulehduksen (otitis media) aiheuttajia ovat pneumokokin lisäksi mm. *Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catarrhalis*. Muista otititin aiheuttajista mainittakoon hieman harvinaisempi *Alloiococcus otitidis*.

Tällä hetkellä hengitystieinfektioiden diagnostiikka on bakteerien 10 osalta pääasiassa bakteriviljelyn varassa. Bakterien viljelemisen on kuitenkin suhteellisen hidasta ja viljelyyn perustuvat diagnostiset menetelmät antavat tuloksia yleensä vasta vuorokausien, joskus jopa viikkojen kuluttua näytteen otosta. Bakterien viljely ei myöskään aina onnistu laboratorio-olosuhteissa. Tämä voi johtua joko siitä, että käytetty viljelymenetelmä ei ole kyseiselle bakteerille soveltuva tai siitä, että potilaalle on ennen näytteen ottamista annettu 15 antibioottihoitoa. Nielutulehdusten diagnostiikassa抗原 osoitukseen perustuvat pikamenetelmät ovat hyviä bakteriviljelyä täydentäviä menetelmiä, mutta niiden ongelmana on suppea lajivalikoima (A-ryhmän streptokokki). Joidenkin bakteri-infektioiden (esim. *C. pneumoniae* ja *M. pneumoniae*) diagnostiikassa voidaan käyttää myös serologisia menetelmiä, mutta nämä menetelmät antavat tuloksia vasta useita viikkoja infektion alkamisen jälkeen eivätkä näin ollen auta potilaan akuutissa hoidossa.

Molekylaariset nukleihappojen monistamiseen ja hybridisaatioon 25 perustuvat menetelmät pyrkivät ratkaisemaan edellä kuvatut bakteriviljelyyn liittyvät ongelmamat. Niiden avulla bakteri todetaan ja tunnistetaan samanaikaisesti, mikä nopeuttaa diagnostiikkaa, eikä aikaa vieviä jatkoviljelyjä tarvita. Antibiootit eivät myöskään häiritse molekylaarisia menetelmiä samassa määrin kuin bakteriviljelyä.

Eräs bakteridiagnostiikassa käytetyistä molekylaarisista menetelmistä on ns. yleis-bakteri-PCR, joka perustuu ns. universaalien alukkeiden käyttöön. Tällä hetkellä käytössä olevissa yleis-bakteri-PCR-menetelmissä käytetään ribosomaalista RNA:ta (16S rDNA/rRNA tai 23S rDNA/rRNA) koodaavien geenien konservoituneille DNA-alueille sijoittuvia alukkeita. Yleis-bakteri-PCR:ään perustuvassa bakterien tunnistuksessa varsinainen tunnitusvaihe toteutetaan kloonaamalla ja sekvensoimalla saatu PCR-tuote. (Katso

esim. EP-patentti 613 502, US-patentti 6 001 564 ja US-patentihakemus 0 020 055 101).

- Yleis-bakteeri-PCR-menetelmää on jonkin verran sovellettu kliiniseen bakteeridiagnostiikkaan, vaikka se soveltuukin parhaiten bakteeri- ja sie-
- 5 nilajien tunnistukseen puhdasviljelmistä, ja tähän tarkoitukseen on kehitelty myös kaupallisia testejä kuten esim. MicroSeq, (Applied Biosystems). Nämä testit eivät kuitenkaan ole laajalti käytössä, sillä PCR-tuotteen kloonaus ja sek-
- 10 venointi on hidasta ja työlästä ja itse testit ja niiden käyttöön tarvittavat laitteistot, kuten esim. sekvensointilaitteet, ovat kalliita ja testien suorittaminen vaatii koulutettua henkilökuntaa.

Toinen bakteeridiagnostiikassa jonkin verran käytetty menetelmä on spesifisiin oligonukleotideihin perustuva multiplex-PCR-menetelmä. Tässä menetelmässä monistamiseen käytetään universaalien ja bakteerilajispesifisten alukkeiden seosta. Hendolin et al. (Journal of Clinical Microbiology, 35: 11, 15 1997) käyttivät multiplex-PCR-menetelmää välikorvantulehdusta aiheuttavien bakteerien tunnistukseen. Kyseisessä menetelmässä käytetään toisena PCR-alukkeena universaalialia, 16S-rRNA:n konservoituneelle geenialueelle sijoittuvaa aluketta ja toisena PCR-alukkeena alukeseosta, joka koostuu neljälle eri bakteerilajille spesifisistä alukkeista. Bakteerilajispesifiset alukkeet on suunniteltu siten, että aikaansaatu PCR-tuote on eripituinen riippuen siitä, mistä bakteerilajista se on peräisin, jolloin tunnistus perustuu syntyvän PCR-tuotteen pituuteen. Vaikka multiplex-PCR menetelmä onkin suhteellisen herkkä ja nopea, menetelmällä on haittamuoria. Tiedetään, että lyhyemmät DNA-jaksot monistuvat tehokkaammin kuin pidemmät jaksot. Jos siis samassa näytteessä on kahda bakteeria, monistuu lyhyemmän tuotteen antavan bakteerin DNA todennäköisesti tehokkaammin, mikä vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Lisäksi multiplex-PCR-menetelmällä pystytään samanaikaisesti tunnistamaan vain muutamia bakteerilajeja, sillä käytännössä on mahdotonta suunnitella kymmeniä spesifisiä PCR-alukkeita siten, että ne toimisivat samoissa PCR-olosuhteissa ja että syntyvät PCR-tuotteet eroaisivat pituudeltaan riittävästi toisistaan. Multiplex-PCR ei siis sovellu esim. hengitystieinfektiodiagnostiikkaan, jossa kliinisesti tärkeitä taudinaiheuttajia tunnetaan toista kymmentä.

Ns. normaaliflooran bakteerit voivat myöskin häiritä multiplex-PCR:ään perustuvaa diagnostiikkaa. Vasta muutamien kymmenien bakteerilajien perimä on kokonaisuudessaan kartoitettu ja suurin osa näistä kartoitetuista lajeista on tunnettuja taudinaiheuttajia. Normaaliflooran bakteereista ja

niiden DNA-sekvensseistä on siis vielä hyvin vähän tietoa. Tämän vuoksi bakterilajispesifisten PCR-alukkeiden suunnittelu ja pelkkään PCR-monistukseen perustuva diagnosointi onkin lähes mahdotonta.

- Myös ribosomaalisen RNA:n käyttöön liittyy ongelmia. Lähisukuisten
- 5 bakterilajien erottaminen toisistaan rRNA-molekyylien avulla on vaikeaa, koska näiden molekyylien sekvensseihin ei evoluution aikana ole kertynyt riittävästi eroja. Ja vaikka lajien välisiä eroja löytyisikin, nämä varioivat kohdat ovat yleensä jakautuneet koko rRNA-molekyylin alueelle (esim. 16S rRNA:n pituus on noin 1500 emästä), mikä rajoittaa diagnostiikassa hyödynnettävien molekyyliaaristen menetelmien käyttöä. Käytännössä lähisukuiset bakterit voidaan siis erottella toisistaan vain sekvensoimalla koko rRNA:ta koodaava geeni, mikä ei sekään aina välttämättä riitä erottamaan lajeja toisistaan.
 - 10

Keksinnön lyhyt selostus

- Esillä oleva keksinnön tarkoituksesta on antaa käyttöön välineitä ja
- 15 keinoja, jotka ovat käytökelpoisia infektioita aiheuttavien, erityisesti hengitystieinfektiota aiheuttavien bakterien diagnostiikassa, mutta joilla ei ole edellä kuvattuja bakterien diagnostiikkaan liittyviä haittoja. Erityisesti keksinnön tarkoituksesta on antaa käyttöön uusia molekylaarisia menetelmiä perustuvassa bakteridiagnostiikassa käytökelpoisia välineitä ja menetelmiä, jotka ovat
 - 20 herkkiä, tehokkaita ja lajispesifisiä ja joiden avulla voidaan tunnistaa vain haluttu bakterit spesifisesti. Keksinnön tarkoituksesta on myös antaa käyttöön menetelmiä, joilla infektion aiheuttava, erityisesti hengitystieinfektiota aiheuttava bakteri voidaan diagnostoida oleellisesti aiempaa nopeammin, jolloin potilaalle voidaan määätää oikea ja tehokas antibioottihoito taudin varhaisemmassa vaiheessa, jolloin taudin kesto lyhenee ja mahdollisten haitallisten, jopa hengenvaarallisten komplikaatioiden riski vähenee.
 - 25

- Esillä oleva keksintö antaa käyttöön bakterilajispesifisiä oligonukleotidikoettimia, jotka ovat peräisin topoisomeraaseja koodaavien geenien, erityisesti *gyrB/parE*-geenien, konservoituneiden alueiden välisiltä ns. hypervarioivilta alueilta, joilla emäsjärjestys on hyvin erilainen eri bakterilajeilla. Näiden bakterilajispesifisten koettimien avulla infektioissa tavattujen bakterien perimääaines voidaan paitsi osoittaa myös samanaikaisesti tunnistaa.

- Keksintö antaa käyttöön myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin topoisomeraaseja koodaavien geenien, erityisesti *gyrB/parE*-geenien, konservoituneilta alueilta ja jotka monistavat tehokkaasti infektioita aiheuttavi-
- 35

en bakteereiden DNA:ta myös kliinisistä näytteistä, jotka sisältävät runsaasti vierasta (ei-bakteeriperäistä) DNA:ta.

- Lisäksi esillä oleva eksintö antaa käyttöön yksinkertaisia, nopeita, herkkiä ja spesifisiä menetelmiä, joilla olemassa olevan tekniikan mukaisten 5 menetelmien haitat voidaan voittaa. Näillä menetelmillä kliinisesti merkittäviä bakteereja voidaan luotettavasti todeta ja diagnostoida kliinisistä näytteistä tai bakteeriviljelmistä.

- Esillä oleva eksintö koskee oligonukleotidikoetinsekvenssejä, jotka hybridisoituvat normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita, erityisesti 10 hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien topoisomeraaseja koodaavien geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevien hypervarioivien alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät jonkin sekvensseistä sekvenssitunnusnumerot 1 - 69 mukaisen sekvenssin tai sen kanssa käänteisen ja komplementaarisen sekvenssin tai näiden toiminnallisen fragmentin.

- 15 Infektioita, erityisesti hengitystieinfektioita, aiheuttavia bakteereja ovat bakteerit *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella 20 pneumophila* ja *Fusobacterium necrophorum* ja topoisomeraasia koodava geeni on *gyrB*- ja/tai *parE*-proteiinia koodava geeni,

Edullisesti oligonukleotidikoetinsekvenssin pituus on 15 - 30, edullisemmin 20 - 30 ja edullisimmin 21 - 25 nukleiinhappoa.

- Esillä oleva eksintö koskee myös edellä mainittujen oligonukleotidikoetinsekvenssien käyttöä bakteerien toteamisessa, tunnistamisessa tai luo-kittelussa.

- Esillä oleva eksintö koskee myös oligonukleotidikoetinseosta, joka sisältää minkä tahansa yhdistelmän, edullisesti kaikki, sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallista fragmenteista. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa haluttu koetinseos on kiinnitetty kiinteälle kantajalle. Edullisesti kiinteälle kantajalle on kiinnitetty oligonukleotidikoetinseos, joka sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69 tai näiden kanssa käänteiset ja komplementaariset sekvenssit sekvenssit.

- 35 Esillä oleva eksintö koskee myös uutta DNA-alukeseosta, joka sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat hengitystieinfektioita aiheuttavien bak-

teerien topoisomeraaseja koodaavien, erityisesti GyrB- ja/tai ParE-proteiinia koodaavien geenien, konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssit tunnusnumero 76 ja 77 mukaiset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit.

5 Esillä oleva eksintö koskee myös mainitun alukeseoksen käyttöä topoisomeraasigeenien, erityisesti GyrB- ja ParE-proteiinia koodaavien geenien, monistamisessa.

10 Esillä oleva eksintö koskee lisäksi diagnostista menetelmää hengitystieinfektiota aiheuttavan bakterin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliini-
sestä näytteestä, jossa menetelmässä

a) klinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen edellä mainittua alukeseosta,

b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa edellä mainittuja koettimia hybridisaatio-olosuhteissa ja

15 c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

Edullisessa eksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa klinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeraasiketjureaktiota käyttäen ja monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakterilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

20 Eraässä edullisessa eksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa klinisestä näytteestä eristetyt DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidia todettavissa olevan kohdejuosten aikaansaamiseksi.

25 Toisessa edullisessa eksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki eksinnön mukaiset lajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, tai niiden käänneiset ja komplementaariset sekvenssit.

30 Vielä eraässä edullisessa eksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty eksinnön mukaiset tietylle tai muutamalle hengitystieinfektiota aiheuttavalle bakterille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on vastaavat sekvenssitunnusnumerot taulukoista 4A ja 4B 1 - 7, 30 - 33, 39 - 42 ja 56 - 65, tai niiden komplementaariset sekvenssit tai näiden käänneiset sekvenssit.

Kuvioiden lyhyt selostus

Kuvio 1 esittää esimerkin (*Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catharralis*) hypervarioivasta *gyrB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservatiivisiin alueisiin. Konservoituneet alueet on merkity harmailla laatikoilla ja ne toimivat 5 universalien *gyrB/parE*-alukkeiden kiinnitymiskohdina. Näiden väliin jää hypervarioiva alue, jolle lajispesifiset koettimet on suunniteltu (alleviivatut kohdat).

Kuviossa 2 esitetään esimerkki hybridisaatiotuloksesta koetin-lasilla. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *S. aureus* -puhdasviljelmästä eristetty 10 DNA:n *gyrB*-monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-dCTP-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasilla oli neljä *S. aureus* bakteerille spesifistä *gyrB*-koetinta (taulukko 4A: oligonukleotidikoettimet 21 - 24), jotka kaikki sitoivat spesifisesti 15 *S. aureus* –kohdejuostetta. Signaalit antoivat lisäksi positiiviset kontrolliong-nukleotidit, joita oli lasilla 5 kpl. Muihin lasilla olleisiin oligonukleotideihin *S. aureus* –kohdejuoste ei sitoutunut.

Kuviossa 3 esitetään PCR-monistustulokset esimerkistä 7, jossa verrattiin tunnettuja *Streptococcus pneumoniae*lle spesifisiksi mainittuja alukkeita *Streptococcus*-suvun bakteerien ja *Moraxella catarrhalikselle* spesifisiksi mainittuja alukkeita *Moraxella*-suvun bakteerien testaamiseen. Tulokset osoittavat, etteivät kyseiset alukkeet kuitenkaan ole lajispesifisiä, vaan ne monistavat myös normaaliflooraan baktereja.

Keksinnön yksityiskohtainen selostus

Esillä oleva keksintö perustuu tutkimuksiin, joissa pyrittiin löytämään spesifisempia vaihtoehtoja ribosomaalisen RNA:n käytölle infektioita aiheuttavien bakterien diagnostiikassa. Tutkimus kohdistettiin muihin geeneihin, jotka ovat elintärkeitä bakteereille. Topoisomeraasit gyraasi B (GyrB eli topoisomeraasi II) ja ParE-proteiinit (topoisomeraasi IV:n toinen alayksikkö) ovat bakteerin kannalta tärkeitä molekyylejä, sillä niitä tarvitaan DNA:n pakkaamisessa. Tiettyt alueet näistä molekyyleista ovat säilyneet evoluution aikana lähes 30 muuttumattomina eli konservoituneet. Tässä yhteydessä termillä "konservoitunut alue" tai "konservoituneet alueet" tarkoitetaankin topoisomeraasigeenin tai –proteiinin aluetta tai alueita, joiden emäsjärjestys tai vastaavasti aminohappojärjestys on säilynyt lähes muuttumattomana eri hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerilajien välillä. Yleensä nämä 35 konservoituneet alueet ovat proteiinin toiminnan kannalta kaikkein tärkeimpää alueita. GyrB/ParE-molekyylit eivät kuitenkaan ole yhtä konservoituneita kuin

- tenkaan ole yhtä konservoituneita kuin ribosomaaliset RNA-molekyylit. Koska kyseessä ovat proteiinimolekyylit, niitä koodaavissa geeneissä on geneettisen koodin luontesta johtuen enemmän eroja nukleihinahappotasolla kuin mitä rakenteellisia RNA-molekyylejä (esim. 16S rRNA -molekyylit) koodaavissa geeneissä. GyrB/ParE-molekyylit eivät myöskään kokonaisuudessaan ole evoluution kuluessa säilyneet yhtä muuttumattomina kuin rakenteelliset RNA-molekyylit: *gyrB/parE*-molekyyleistä on löydettäväissä myös lyhyitä jaksoja, joissa erot eri bakterilajien välillä ovat niin suuria (myös lähisukuisten välillä), että kyseisiä jaksoja voidaan pitää lajispesifisinä.
- Edellä mainittuja ominaisuuksia käytettiin hyväksi bakterilajeille spesifisten koettimien suunnittelmissä. Lajispesifisten koettimien (eli oligonukleotididen) (taulukot 4A ja 4B) suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuva suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakterien *gyrB*- tai *parE*-geenit linjattiin referenssibakteereista lähtöisin olevien vastaavien geenien kanssa. Sekvenssit saattiin EMBL:n sekvenssitetokannasta tai tuotettiin itse kloonaamalla niistä bakterilajeista, joista *gyrB/parE*-sekvenssiä ei ollut saatavilla julkisista sekvenssitetokannoista. Sekvenssit tuotettiin monistamalla bakteripuhdasviljelmistä haluttu *gyrB/parE*-sekvenssijakso, joka sitten klonattiin ja sekvensoitiin. Esimerkki kahden bakterin, *Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catharralis*, hypervarioivasta *gyrB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservatiivisiinalueisiin, on esitetty kuviossa 1. Konservoituneet alueet on merkitty harmailla laatikoilla ja ne toimivat universaalien *gyrB/parE*-alukkeiden kiintymiskohina. Näiden väliin jää hypervarioiva alue, jolle lajispesifiset koettimet on suunniteltu (alleviivatut kohdat).
- Sekvenssien linjauksessa käytettiin BioEdit-ohjelmaa ja ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakterien geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien geeneistä. Näistä jaksoista valittiin sopivan pituiset (esim. 21 - 25 emästä) sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi. Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryoottitietokantaan FASTA-algoritmiä käyttävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat muiden kuin suunnittelun kohteena olevien bakterien *gyrB/parE*-geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko

oligonukleotidit hiusneularakenteita. Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden Tm-lämpötila oli vähintään 45 °C, valittiin kokeellisiin spesifisyyystutkimuksiin. Laboratoriossa koettimien spesifisyys testattiin ensin useilla eri bakterilajeista eristetyillä DNA-näytteillä 5 (esimerkki 3, taulukko 3) sekä lisäksi potilasnäytteillä (esimerkki 6, taulukko 5).

Esillä olevan keksinnön mukaiset oligonukleotidikoettimet käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 1 – 69 mukaiset sekvenssit tai niiden kanssa käänneiset ja komplementaariset sekvenssit tai näiden käänneiset sekvenssit. Ne voivat olla eripituisia, ja niiden sopivan pituuden määrää vain haluttu laji-10 spesifisyys ja toimivuus hybridisaatioreaktiossa. Tavallisesti ne ovat 15 – 30, edullisesti 20 – 30 ja edullisimmin 21 – 25, nukleotidiä pitkiä. Koettimet voivat myös olla eri tavoin modifioituja (ne voivat esimerkiksi sisältää modifioituja nuk-15 leotidejä, kuten inosiini), niihin voi olla liitettyä erilaisia kemiallisia yhdisteitä tai ryhmiä (esim. aminoryhmiä) tai muita molekyylejä, kuten erilaisia detektioon 20 tarvittavia leimoja tai niistä voi kokonaan puuttua modifikaatiot. Edullisten keksinnön mukaisten bakterilajispesifisten koettimien sekvenssit ja spesifisyys on esitetty taulukoissa 4A ja 4B ja niillä on sekvenssien tunnusnumerot 1 – 69 mukaiset sekvenssit. Luonnollisesti näiden oligonukleotidisekvenssien käänneiset ja komplementaariset sekvenssit ovat yhtä käyttökelpoisia ja edullisia, ku-25 ten alan ammattimiehelle on ilmeistä. Samoin mainittujen oligonukleotidi- sekvenssien toiminnalliset fragmentit ovat käyttökelpoisia koettimina edellyttäen, että lajispesifisyys säilyy.

PCR-alukkeiden suunnittelua varten eri fylogeneettisistä ryhmistä 25 valittujen bakterien, jotka on esitetty taulukossa 2, gyrB-proteiinien (GyrB) aminohipposekvenssit linjattiin BioEdit -ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta löytyi useita konservoituneita alueita, jotka otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi. ParE-proteiini on GyrB-proteiinin sukulainen ja tietyillä baktereilla (gram-positiiviset bakterit) edellä mainitut konservoituneet kohdat löytyvät molemmista geeneistä. Kon-30 servoituneet aminohippojaksot käännettiin takaisin nukleihinhipposekvenssiksi. Geneettisen koodin luontesta johtuen alukkeisiin tuli useita degeneroituneita kohtia. Konservoituneiden jaksojen perusteella valmistettiin useita alukepareja, joita testattiin laboratoriossa (spesifisyys- ja herkkyydestaukset). Laboratoriotestien perusteella todettiin, että puhtaan bakteri-DNA:n 35 monistuminen onnistuu hyvin osalla alukepareista, ja alukkeilla voidaan monis-

taa kaikkien bakteerien *gyrB/parE*-geenejä. Kyseiset alukkeet toimivat siis universaleina alukkeina bakteereille.

- Yksi alukepareista osoittautui herkkyydeltään muita paremmaksi ja tallä alukeparilla jatkettiin testejä klinisistä näytteistä. Osoittautui kuitenkin, että 5 alukepari ei pysty monistamaan bakteri-DNA:ta klinisistä näytteistä, joissa on mukana ylimäärin ihmisen DNA:ta. Tästä syystä alukeparia muutettiin ja degeneroitumisen suhteen etsittiin uusia alukevaihtoehtoja, jotka toisaalta toimisivat myös klinistä näytteistä, mutta jotka samalla säilyttäisivät riittävän laajan spesifisyyden eli niiden avulla voitaisiin monistaa kaikkien hengitystieinfektoita 10 aiheuttavien bakterien *gyrB/parE*-geenit. Toimiva alukepari on esitetty taulukossa 1. Tämän alukeparin avulla kaikkien fylogeneettisesti hyvinkin etääällä toisistaan olevien bakterien *gyrB/parE*-geenit (taulukko 3) voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen DNA:ta.

15

Taulukko 1. *gyrB/parE*-universaalialukkeet

Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'->3'
gB1F	CGTCCWGGKATGTAYATHGG
gB2R	CCHACRCCRTGWAACCDCC

Alukesekvensseissä

- W tarkoittaa emästä A tai T,
20 K tarkoittaa emästä G tai T,
Y tarkoittaa emästä C tai T,
H tarkoittaa emästä A tai C tai T,
R tarkoittaa emästä A tai G ja
D tarkoittaa emästä A tai G tai T.
25 Kyseessä ovat siis alukesekset, jotka koostuvat useista eri alukevaihtoehdosta. Esim. alukkeen gB1F tapauksessa seoksessa on siis alukkeita, joissa W:n kohdalla on A (adeniini) ja alukkeita jossa W:n kohdalla on T (tymidiini).
Keksinnön mukaisesti spesifisiä koettimia voidaan käyttää infektioita, erityisesti hengitystieinfektoita aiheuttavien bakterien tunnistamiseksi missä tahansa sopivassa menetelmässä, jolla hybridisaatio voidaan osoittaa. Tällaiset menetelmät ovat alan ammattilaisten hyvin tuntemia ja ne voidaan toteut-

- 30

taa sekä liuoksessa että DNA:ta sitovalla kiinteällä kantajalla, kuten nitroselluloosa- tai nylonkalvolla, tai lasilla.

- Edullisessa keksinnön mukaisessa menetelmässä toteaminen tehdään käyttäen DNA-siruteknikkaa, jolloin DNA-sirulla tai DNA-lastulla (chip) tarkoitetaan pienikokoista alustaa, jolle tunnettuja nukleiinihappojaksoja on kiinnitetty tiettyyn ennalta määärättyyn järjestykseen. Jos sirulle kiinnitetyt nukleiinihappojaksot ovat lyhyempiä kuin 100 emäsparia (yleensä noin 20 - 30 emäsparia), puhutaan ns. oligonukleotidisiruista.

- Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä analysoitava näyte voi olla bakteeriviljelmä, kudospala, eritenäyte, kuten yskös- tai sivelenäyte, verinäyte tai muu sopiva näyte, erityisesti eritenäyte kliinisissä diagnostisissa sovelluksissa.

- Analysoitavasta näytteestä eristetään DNA millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla DNA:n eristyskitteillä (esim. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche; NucleoSpin, BD Biosciences Clontech tai QIAamp DNA Mini-kit, Qiagen) tai perinteisillä fenoli-kloroformi tai vastaavilla orgaanisilla liuottimilla tehtävillä uutoilla, joko manuaalisesti tai erityisillä DNA:n eristykseen soveltuville laitteilla. Edullisesti käytetään helpon saatavuuden, nopeuden ja toistettavuuden vuoksi kaupallisia kittejä.

- Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä DNA:n monistukseen käytettäväät reagenssit voivat olla mitä tahansa alalla DNA:n monistukseen käytettyjä reagensseja, jotka alan ammattimiehet hyvin tuntevat. Sopivia ja edullisia kaupallisesti saatavissa olevia reagensseja ovat erityyppiset Taq-DNA-polymeraasit ja niiden puskurit (esim. AmpliTaqGOLD, AmpliTaqLD, DyNAzyme, TaqPlus Precision ja HotStartTaq), nukleotidit tai valmiit nukleotidi-seokset (esim. Sigma, Applied Biosystems, Amersham Biosystems), MgCl₂ (jolloin yleensä käytetään saman valmistajan tuotetta kuin Taq-DNApolymeraasi), Cy5-dCTP (esim. NEN LifeSciences, Amersham Biosciences).

- Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä kloonaus voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla kloonauskitillä (esim. Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN tai TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Kloonaustuotteen sekvensointi voidaan suorittaa millä tahansa tähän tarkoitukseen soveltuvalla sekvensaattorilla (esim. Applied Biosystems, mallit 373A, 377 tai 3100 tai Bio-Rad Sequi-Gen GT) tai manuaalisella sekvensoinnilla. Sekvenssitolokset voidaan analysoida manua-

lisesti tai täähän tarkoitukseen kehitetyillä sekvenssianalyysiohjelmilla (Applied Biosystems Sequencer tai InforMax:in Vector NTI Suite Version 7).

Monistukseen käytettävä laitteisto voi niin ikään olla mikä tahansa sopiva laitteisto (esim. T1 Thermocycler, Biometra tai GenAmp PCR system

- 5 2700, Applied Biosystems). Käytännössä kaikki DNA-monistukseen sopivat laitteet ja laitteistot sopivat tarkoitukseen ja monistus voidaan myös suorittaa manuaalisesti siirtämällä reaktioputkia lämpötilasta toiseen. Monistus voidaan myös tehdä suoraan DNA-sirulla.

Monistustuotteen puhdistus voidaan suorittaa millä tahansa kaupallisella menetelmällä (esim. High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, MicroSpin S-400 tai S-300 HR Columns, Amersham Biosciences tai QIAquick PCR-purification-Kit, Qiagen) tai se voidaan tehdä orgaanisella liuottimella tapahtuvalla uutolla. Monistustuotetta voidaan käyttää hybridisaatioreaktioon myös sellaisenaan ilman puhdistusta tai uuttoa.

- 10 15 Yksijuosteisen kohdejuosteenva aikaansaamiseksi voidaan käyttää mitä tahansa tunnettua menetelmää. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi epäsymmetrinen PCR, eksonukleaasimenetelmää tai yksijuosteisen kohdejuosteenva syntetisointi suoraan sirulla (esim. matriXarray, Roche Applied Science). Keksintö käsitteää myös sovellukset, joissa hybridisaatioreaktioon 20 voidaan käyttää kaksijuosteista monistustuotetta. Tässä edullinen menetelmä yksijuosteisen kohdejuosteenva aikaan saamiseksi on epäsymmetrinen PCR.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan leimata kohdejuosteenva aikaansaamiseksi käyttää mitä tahansa sopivaa leimaa. Sopivia leimoja ovat fluorerenssileimat (esim. Cy5, Cy3, Cy2, TexasRed, FITC,

- 25 Alexa 488, TMR, FluorX, ROX, TET, HEX), radioaktiiviset leimat (esim., ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S) ja kemiluminesoivat leimat (esim. HiLight Single-Color Kit). Tässä keksinnössä Cy5-dCTP fluoresenssileima (Amersham Biosciences) on edullinen. Keksintö käsitteää myös sovellukset, joissa leimaa ei tarvita lainkaan, kuten sellaiset, joissa toteaminen perustuu sähköiseen impulssiin (esim Motorolan eSensor).

Kun hybridisaatio tapahtuu kiinteällä kantajalla, hybridisaatiossa käytettävät koettimet voidaan kiinnittää alustaansa kovalenttisen tai eikovalenttisen sidoksen avulla tai kiinnittämisesi voidaan käyttää muuta olemassa olevaa kemiallista, sähkökemiallista tai vastaavaa menetelmää. Alusta, 35 jolle koettimet kiinnitetään voi olla valmistettu lasista, muovista, metallista, nai-ionista, nitroselluloosasta, polyakryyliamidista, silikonista tai näiden yhdistel-

mistä, ja sen koko voi vaihdella muutamasta millimetristä kymmeniin senttimetriin. Käytettävän alustan pintakäsittely voi olla aminosilaani- tai mikä tahansa muu soveltuva pintakäsittely, kuten esimerkiksi epoksisilaanipintakäsittely, tai voidaan käyttää sellaista alustaa, joka ei vaadi erillistä pintakäsittelyä. Tässä

- 5 edullinen alusta koettimille on aminosilaanilla käsitelty mikroskooppilasi (Genorama, Asper Biotech Ltd., Eesti).

Koettimet voidaan printata käytettäville alustalle millä tahansa kau-
palliseesti saatavilla olevalla ja tähän tarkoitukseen soveltuvalla laitteistolla
(esim. Qarray-mini arraying system, Lucidea Array Spotter tai OmniGrid, Ge-
neMachines arrayer) tai ne voidaan pipetoida alustalle manuaalisesti. Koetti-
met voidaan myöskin syntetisoida suoraan alustalle esimerkiksi fotolitografiaa
käyttämällä.

Hybridisaatiossa käytetty hybridisaatioseos voi olla koostumukseltaan erilainen kuin mitä jäljempänä suoritusesimerkeissä on esitetty, mm. suo-
15 lan koostumus ja/tai suolapitoisuus voidat vaihdella (esim. 2-4xSSC tai SSPE) tai hybridisaatiossa voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevia hybridisaa-
tioliuoksia (esim. ArrayHyb, Sigma). Hybridisaatioseoksessa voidaan myöskin
käyttää denaturoivia tai stabiloivia lisääaineita (esim. formamidi tai DMSO, di-
metyylisulfoksiidi) tai aineita, jotka vähentävät epäspesifistä sitoutumista (esim.
20 BSA eli naudan seerumin albumiini tai ssDNA eli lohen maidin DNA). Hybridisa-
atio voidaan tehdä eri hybridisaatiolämpötilassa (yleensä välillä 40 - 70 °C)
ja hybridisaatioon käytettävä aika voi vaihdella riippuen sovelluksesta muuta-
masta minuutista vuorokauteen. Hybridisaatio voidaan vesihauteen sijaan teh-
dä esim. lämpökaapissa tai erityisessä hybridisaatiolaitteessa (esim GeneTAC
25 HybStation tai Lucidea Slidepro Hybridizer). Hybridisaation jälkeiset pesut voi-
vat myösken kestoltaan, määrältään, lämpötilaltaan ja käytettävän pesuliuoksen
koostumukseltaan olla erilaiset kuin mitä tässä on esitetty. Lasien pesu voi-
daan myös suorittaa erillisellä laitteella. Joissakin tapauksissa hybridisaation
jälkeinen lasin tai sirun pesu ei ole väältämätön, vaan siru voidaan analysoida
30 heti hybridisaation jälkeen. Tässä edullinen hybridisaatio-olosuhde on +57 °C
vesihauden, jossa laseja hybridisoitiin 12 - 16h.

Koetinlasit tai -sirut voidaan analysoida millä tahansa tähän tarkoi-
tukseen soveltuvalla laitteistolla tai lukijalla (esim. GeneTAC UC4, GenePix
Personal 4100A tai Agilent DNA Microarray Scanner) Jos kohdejuoste on lei-
35 mattu fluoresoivalla leimalla, voidaan analysointiin käyttää myös esim. fluore-
senssimikroskooppia. Jos leimana on käytetty radioaktiivista leimaa, voidaan

siru tai kalvo analysoida autoradiografialla. Jos hybridisaatio on tehty elektronisella sirulle ja toteaminen perustuu esim. sähköiseen impulssiin, analysoidaan ne tätä tarkoitusta varten suunnitellulla laitteistolla.

- Vasta muutamien kymmenien bakteerilajien perimä on kokonaisuudessaan kartoitettu ja suurin osa näistä kartoitetuista lajeista on tunnettuja tau-dinauheuttajia. On siis vielä hyvin vähän tietoa ns. normaaliflooran baktereista ja niiden DNA-sekvensseistä. Tämän vuoksi bakterilajispesifisten PCR-alukkeiden suunnittelu ja pelkkään PCR-monistukseen perustuva diagnostiikka onkin lähes mahdotonta.

- Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä ei kärsi tunnetun teknikan ongelmista. Menetelmän monistusvaihe on hyvin herkkä ja universaalit alukkeet monistivat tehokkaasti tietyn geenialueen (*gyrB/parE*) fylogenettisesti erilaisista bakterilajeista riippumatta siitä, oliko kyseessä gramnegatiivisen vai grampostiivisen soluseinän omaava bakterilaji (taulukko 3). Lisäksi monistustuote on lyhyt (noin 300 emäsparia), mikä edesauttaa monistusreaktion tehokkuutta.

Bakterilajispesifiset koettiimet on suunniteltu *gyrB/parE* geenialueelle, joka on huomattavasti variovampi geenialue kuin esim. 16S rRNA -alue, jota on aiemmin käytetty bakteridiagnostiikassa. Vaikka menetelmässä käytetyt universaalit alukkeet monistavatkin tehokkaasti myös normaaliflooran baktereita, tämä ei aiheuta väärää positiivisia, sillä keksinnön mukaiset koettiimet ovat hyvin lajispesifisiä ja tunnistavat vain ne bakterit, joita varten ne on suunniteltu. Hybridisoitaessa lasille esim. *Streptococcus pneumoniae* -puhdasviljelmästä monistettua kohdejuostetta, hybridisoituu se ainoastaan *Streptococcus pneumoniae* -spesifisten koettiimien ja positiivisen kontrollikoettimen kanssa. Toisaalta hybridisoitaessa lasille vain normaaliflooran bakterista, esim. *Streptococcus mitis*, monistettua kohdejuostetta, se ei sitoudu yhteenkään patogeenikoettimeen, vaan ainoastaan positiiviseen kontrollikoettimeen (esimerkki 7, taulukko 6). Kaikki esillä olevan keksinnön mukaiset spesifiset oligonukleotidikoettimet testattiin ristiin eri bakterilajien ja myös useiden normaaliflooraan kuuluvien lajen kanssa, eikä ristireaktioita tapahdu (kuva 2, taulukko 6). Siten esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä on selvästi herkempi ja spesifisempi kuin aiemmin kuvatut vastaavantyyppiset menetelmät.

- Seuraavaksi keksintöä valaistaan tarkemmin esimerkkien avulla. Menetelmää kuvattaessa on viitattu erilaisiin, tässä sovelluksessa käytettyihin

laitteistoihin, materiaaleihin, lämpötiloihin, kemikaaleihin tai vastaaviin. Nämä voivat luonnollisesti vaihdella keksinnön eri sovelluksissa tarkoituksenmukaisella tavalla, eivätkä eksintö ja sen suoritusmuodot siten rajoitu alla kuvattuihin esimerkkeihin.

5 Esimerkki 1. Keksinnön mukaisten PCR-alukkeiden suunnittelu

PCR-alukkeiden suunnittelua varten eri fylogeneettisistä ryhmistä valittujen bakteerien (taulukko 2) *gyrB*-proteiinien (*GyrB*) ja sen sukulaaisproteiinin *ParE* aminohapposekvenssit linjattiin BioEdit-ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia. *GyrB*:n linjauksesta löytyi useita konservoituneita alueita. Tutkituille grampositiivisille baktereereille samat konservoituneet kohdat löytyivät myös *parE*-geenistä.

Nämä konservoituneet aminohappojaksot otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi. Ensin ne käännettiin takaisin nukleiiinhapposekvenssiksi, jolloin niihin tuli geneettisen koodin luontesta johtuen 15 useita degeneroituneita kohtia. Sitten konservoitujen jaksojen perusteella syntetisoitiin (alukkeet syntetisoi Sigma-Genosys, Englanti, josta alukkeet tilattiin tilauspalvelun kautta www.sigma-genosys.co.uk) useita alukepareja, jotka testattiin spesifisyyden ja herkkyyden suhteen. Spesifisyys testattiin monistamalla 20 taulukossa 4 esitynistä eri bakteerilajeista eristettyä DNA jäljempänä olevassa esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Alukeparin herkkys määritettiin analysoimalla, kuinka pieni pitoisuus *H. influenzae* DNA:ta eri alukepareilla voitiin todeta käyttäen jäljempänä esimerkissä 4 kuvattua monistus- ja toteamismenetelmää.

Näiden testien perusteella todettiin, että puhtaan bakteeri-DNA:n monistuminen onnistui hyvin osalla alukepareista, ja alukkeilla voitiin monistaa kaikkien tutkittujen bakteerien *gyrB*/*parE*-geenejä. Kyseiset alukkeet toimivat siis universaaleina alukkeina baktereille. Alukkeiden herkkyydet vaihtelivat ja herkkyydeltään parhainta alukearia käytettiin kliinisten näytteiden (välikorvatulehdusnäytteiden) tutkimiseen. Osoittautui kuitenkin, ettei alukeari ollut riittävän sensitiivinen, sillä se ei pystynyt monistamaan bakteeri-DNA:tta kliinisistä näytteistä, joissa on mukana ylimmäärin ihmisen DNA:ta.

Tästä syystä syntetisoitiin uusia, degeneroitumisen suhteen erilaisia alukepareja (alukkeet syntetisoi Sigma-Genosys, Englanti, josta alukkeet tilattiin tilauspalvelun kautta www.sigmaplasmid.com), joiden spesifisyys ja herkkyys tutkittiin edellä kuvatulla tavalla sekä puhtaalla bakteeri-DNA:lla, että kliinisistä näytteistä eristetyllä DNA:lla. (taulukossa 5 mainitut näytteet). Toimiva alukepari oli alukeseos, joka sisälsi sekvenssit

CGTCCWGGKATGTAYATHGG (sekvenssi tunnusnumero 77) ja
CCHACRCCRTGWAACCDCC (sekvenssi tunnusnumero 78),
jotka nimettiin gB1:ksi ja vastaavasti gB2R:ksi (taulukko 1), jolloin
W tarkoittaa emästä A tai T,

- 5 K tarkoittaa emästä G tai T,
Y tarkoittaa emästä C tai T,
H tarkoittaa emästä A tai C tai T,
R tarkoittaa emästä A tai G ja
D tarkoittaa emästä A tai G tai T.

10 Tämä alukeseos tunnistti kaikilla tutkituilla baktereilla konservoituneet alueet *gyrB*- ja/tai *parE* -geenin alkuosasta. Se toimii kliinisillä näytteillä ja on säilyttänyt riittävän laajan spesifisyyden, jolloin sen avulla voidaan monistaa kaikkien hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien *gyrB*/*parE*-geenit (katso esimerkit 6 ja 7). Erityisesti tämän alukeparin avulla fylogeneettisesti
15 hyvinkin etäällä toisistaan olevien bakteerien (taulukko 3) *gyrB*/*parE*-geenit voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen DNA:ta.

Taulukko 2. Bakteerit, joiden *gyrB*-proteiinien (GyrB) aminohappose-kvenssejä käytettiin linjaukseen.

5

Suku	Laji
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>maritima</i>
<i>Chlamydia</i>	<i>pneumoniae</i>
<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>
<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
<i>Bartonella</i>	<i>bacilliformis</i>
<i>Aquifex</i>	<i>aeolicus</i>

10

15

20

25 **Taulukko 3. Alukkeiden ja koettimien spesifisyyden ja sensitiivisyyden testaamisessa käytetty bakteerikannat**

Bakteerilaji	Toimittajan koodi (näytteen tyyppi)
<i>Hemophilus influenzae</i>	ATCC 51907D (DNA)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 53420D (DNA)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531D (DNA)
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152D (DNA)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 47085D (DNA)

<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143 (bakt.kanta)
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566 (bakt.kanta)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	DSM 20698 (bakt.kanta)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 (bakt.kanta)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus oralis</i>	DSM 20627 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus mitis</i>	DSM 12643 (bakt.kanta)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978 (bakt.kanta)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DSM 8925 (bakt.kanta)
<i>Moraxella cataviae</i>	ATCC 14659 (bakt.kanta)
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	ATCC 13669 (bakt.kanta)
<i>Moraxella cuniculi</i>	ATCC 14688 (bakt.kanta)
<i>Chalmydia pneumoniae</i>	ATCC VR 1355 (bakt.kanta)

ATCC = American Type Culture Collection

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

5 Esimerkki 2. Keksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnitelussa tarvittavien uusien sekvenssien tuottaminen kloonaamalla

10 Bakteerien *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ja *Haemophilus. parainfluenzae* gyrB-sekvenssit, jotka eivät ole saatavilla julkisista sekvenssitetokannoista, syntetisoitiin seuraavassa esitetyn yleisen menetelmän mukaisesti käytettäväksi eksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnittelussa.

15 Bakteripuhdasviljelmistä eristetään ensin DNA käyttäen QIAamp DNA Mini -kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, halutulta DNA-alueelta monistetaan kloonaukseen käytettävä kohdejuoste symmetristä (tavallista) polymeraasi-ketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteestä eristetty DNA esimerkissä 1 valmistettujen universaalien bakterialukkeiden ja muiden monistukseen tarvittavien komponenttien kanssa. Tällöin kloonaus-PCR:ssä 25 µl:n reaktioseos sisältää 20 pmol gB2r-alukeseosta, 20 pmol gB1F-alukeseosta, 200 µM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, USA), 1 x Hot Start Taq

PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon lisätty MgCl₂:a siten, että lopullinen konsentraatio on 2,8 mM, 7,5 % DMSO:ta (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 µl eristettyä DNA:ta.

- 5 Kloonaus-PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: 15 min alkudenaturaatio lämpötilassa 95 °C, 40 sykliä 1 min lämpötilassa 95 °C, 1 min lämpötilassa 50 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen
10 tarkastetaan geelielektroforeesilla 2-%:isessä agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia.

Itse kloonaus tehdään välittömästi PCR-reaktion jälkeen TOPO TA Cloning Kit -pakkauksella (Invitrogen). Kloonausreaktioseos sisältää 4 µl PCR-tuotetta, 1 µl suolaseosta (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) ja 1 µl TOPO-vektoria (pCR 4-TOPO), jotka sekoitetaan keskenään eppendorfputkessa. Seosta inkuboidaan 5 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen seosputki siirretään jäille. Tämän jälkeen tehdään kemiallinen transformaatio, jossa jäähtynytä PCR-tuote-vektori-seosta lisätään 2 µl kompetenteille TOP10 *E. coli* -soluille (50 µl soluja). Tämän jälkeen soluja inkuboidaan jäillä 10 min. Seuraavaksi tehdään 20 lämpösokkikäsittely, jossa soluputki siirretään +42 °C:een 30 sekunnin ajaksi. Sitten putki siirretään jäille ja siihen lisätään 250 µl huoneenlämpöistä SOC-liuosta (2 % tryptoni, 0,5 % hiivauute, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoosi). Tämän jälkeen putkea ravistellaan vaaka-asennossa (200 rpm) +37 °C:ssa 1 tunti. Seuraavaksi 20 µl seosta maljataan 25 LB-bakteerimaljalle (Luria-Bertani, 10 % tryptonia, 0,5 % hiivauutetta, 1,0 % NaCl, 1,5 % L-agar:ia laimennettuna veteen, pH 7), joka sisältää 50 g/ml ampiillinia. Maljoja kasvatetaan +37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä maljalta valitaan kymmenen pesäkettä, joista tehdään sekvenointi-PCR.

- 30 Sekvenointi-PCR:ssä 50 µl:n reaktioseos sisältää 0,4 pmol M13-reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') ja M13-forward (5'-GTAAACGACGGCCAG) -alukkeita (sisältyvät kittiin), 150 µM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, Yhdysvallat), 1 x Hot Start Taq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), 1 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa). Monistusta varten pieni osa bakteeripesäkkeestä siirretään näytetikulla PCR-seosputkeen.
35

- Sekvensointi-PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: 15 min alkudenaturaatio lämpötilassa 95 °C, 30 sykliä 1 min lämpötilassa 94 °C, 1 min lämpötilassa 55 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geelitelektroforeesilla 2%:isessa agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia. Tämän jälkeen PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet, nukleotidit, puskuri ja polymerase-asiintyyvi QIAquick PCR -puhdistuskitillä (Qiagen, Sakska).
- 10 Puhdistuksen jälkeen vektoriin insertoitunut fragmentti sekvensoi daan. Kaksitoista mikrolitraa sekvensointireaktioseosta sisältää 100 ng PCR-tuotetta ja 5 pmol joko M13-reverse tai M13-forward-aluketta. Sekvensointi tehdään BigDye Terminator Version 3.0 -kitillä ja ABI PRISM 3100 -laitteistolla (Applied Biosystems, Yhdysvallat). Sekvenssit analysoidaan Vector NTI Suite 15 Version 7-ohjelmistolla (InforMax).

Edellä kuvatulla yleisellä menetelmällä tuotettiin *gyrB*-sekvenssit seuraaville bakterilajeille: *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ja *Haemophilus parainfluenzae* (sekvenssit tunnusnumero 70 - 75).

20 Esimerkki 3. Lajispesifisten koettimien suunnittelu

Lajispesifisten oligonukleotidien eli koettimien suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuvaan suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakterien *gyrB*- tai *parE*-geenit linjattiin muutamasta referenssibakteerista (läheistä sukua olevasta bakterista) lähtöisin olevien vastaavien geenien 25 kanssa. Esimeriksi *Streptococcus pneumoniae* *gyrB*-geeni linjattiin bakteereista *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus aureus* ja *Fusobacterium necrophorum* *gyrB*-geenien kanssa. *S. oralis* ja *S. mitis* ovat *S. pneumoniae* läheistä sukua olevia bakteereja, eivätkä oligonukleotidit saa reagoida näiden normaaliflooraanaan kuuluvien bakterien kanssa. Sekvenssit saatatiin EMBL:n sekvenssittietokannasta tai ne tuotettiin kloonaamalla esimerkissä 2 kuvatulla tavalla.

30 Sekvenssien linjauksessa käytettiin Bio Edit -ohjelmaa ja ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakterien geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien gee-

neistä. Näistä jaksoista valittiin sopivanpituiset sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi (21 - 25 emästä). Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryoottitietokantaan FASTA-algoritmiä käytävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat muiden kuin 5 suunnittelun kohteena olevien bakteerien *gyrB/parE* -geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko oligonukleotidit sekundaarirakenteita. T_m ($^{\circ}\text{C}$) laskettiin kaavalla

$$81,5 + 16,6 \log [\text{Na}]+0,41(\% \text{GC}) - 0,61 (\% \text{for}) 500/\text{N},$$

10 jolloin Na on monovalenttisten kationien pitoisuus (laskuissa 50 M), %GC on guaniini- ja sytosiini-emästen osuus prosentteina, %for on formalipiisi-pitoisuus (laskuissa 0 %) ja N on oligonukleotidin pituus. Sekundaarirakenteiden muodostumista tutkittiin Sigma-Genosysin tarjoamaa ohjelmaa käyttäen. Ohjelma voi käyttää [www-selaimen avulla osoitteesta \$\text{http://www.sigmaplot.com/oligos/frameset.html}\$](http://www.sigmaplot.com/oligos/frameset.html) (calculators/basic calculator). Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden 15 T_m -lämpötila oli vähintään 45 $^{\circ}\text{C}$ valittiin kokeellisiin spesifisyyystutkimuksiin.

Oligonukleotidikoettimet syntetisoitiin ja samalla modifioitiin 5'-päästään (NH_2 -modifioidut oligot) (Sigma-Genosys, Englanti). Laboratoriossa 20 koettimien spesifisyys testattiin useilla eri bakterilajeista eristetyillä DNAnäytteillä (taulukko 3) sekä potilaasnäytteillä (taulukko 5) esimerkeissä 4 ja 5 kuvatuilla tavoilla. Testatuista koettimista valittiin ne, jotka toimivat parhaiten ja osoittautuivat kaikkein spesifisimmiksi. Bakterilajispesifisten koettimien sekvenssit ja spesifisyys on esitetty taulukoissa 4A ja 4B.

Taulukko 4A. gyrB-oligonukleotidisekvenssit

Oligonukleotidi/ sekvenssinumero	Spesifisyys (gyrB-geeni)	Sekvenssi (5'-3')
1/1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CTCAAAAGAAGGTCTTACCATC
2/2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GCCATATTCAAGTTTATTGAG
3/3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AGCCAGATGATTCGATTACTGTT
4/4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TTGAGACCCTCTTACAGTCCTT
5/5	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTTTGCCCTCTCATATTAAAGTC
6/6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TCTTATTGAAGCAGATAATTCC
7/7	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CGTTGAAACAGTTTACAGTCT
8/8	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTCTTCATCATCTAGTCTATGA
9/9	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTTGTAGACWACAGCATTGACG
10/10	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AGCCATGGCAGSTTATTGCTCTA
11/11	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGATTGATGTTSGCATTAGAG
12/12	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGGTATTGTCWTCGTAGATAATG
13/13	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	TTATTGCTCTAGGATTGATGTT
14/14	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GCATTTAGAGSACGGGGTATT
15/15	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TCAAACTAACCTTAAAGACAAC
16/16	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TGAAAACAGTGTACGGTACTCC
17/17	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATGATAATTCTGTATCGGTGCAA
18/18	<i>Haemophilus influenzae</i>	AGCAGAAGTTATTATGACTGTGC
19/19	<i>Haemophilus influenzae</i>	GACGATAACTCTTATAAGTATC
20/20	<i>Haemophilus influenzae</i>	GATACCGATGACGGTACTGGTTG
21/21	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGTGTGGAAATTGTCGATAATA
22/22	<i>Staphylococcus aureus</i>	TGAAGTTGTTATTGAAAAAGATAAC
23/23	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGATTAAAGTAACGGATAACGGA
24/24	<i>Staphylococcus aureus</i>	CTGTCGAAGTTATTTAACTGTTT
25/25	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGACTTCAGAGAGAGGTTGCAC
26/26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GAAATCAGCATCACCATCCATAC
27/27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATACGGATGAGTCGATCACTGTC
28/28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACGACAACACCTACAAGGTGTC
29/29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACACCGACGATGGCACCGGTCTG
30/30	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	TTCGACAACAACAGCTACAAAT
31/31	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATATGGTGTGAAGTATTGGAC

32/32	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GACAAAATCACGGTAACGATACA
33/33	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GACAACAACAGCTACAAATCTC
34/34	<i>Escherichia coli</i>	TATTCGAGGTGGTAGATAACGCT
35/35	<i>Escherichia coli</i>	TTCACGCCGATAACTCTGTCTCT
36/36	<i>Escherichia coli</i>	CGCCGATAACTCTGTCTGTAC
37/37	<i>Escherichia coli</i>	GACGATAACTCCTATAAAGTGTC
38/38	<i>Escherichia coli</i>	GACACGGATGACGGCACCGGTCTG
39/39	<i>Moraxella catarrhalis</i>	AGCTGCCGAGGTTATTATGACGG
40/40	<i>Moraxella catarrhalis</i>	GATGATAATTCATACAAAGTATC
41/41	<i>Moraxella catarrhalis</i>	TGTGGATATCCACCCCTGAAGAAG
42/42	<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATACCGATGATGGTACAGGCTTG
43/43	<i>Legionella pneumophila</i>	GATGATAATT CCTACAAGGTATC
44/44	<i>Legionella pneumophila</i>	AGCAGCCGAAGTCATCATGACAG
45/45	<i>Legionella pneumophila</i>	TGTAGATATTCTATAAAGAAGAAG
46/46	<i>Legionella pneumophila</i>	ATACAGATGATGGAACCGGTTTG
47/47	<i>Legionella pneumophila</i>	CAGATGATGGAACCGGTTGCAT
48/48	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CAACATCAGCCAGGGGATTACAT
49/49	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	GGAATTCCAGTAGACATACATCC
50/50	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	TGAAAATGATAACTATAAAGTGTC

Taulukko 4B. ParE oligonukleotidisekvenssit

Oligonukleoti-di/sekvenssinumero	Spesifisyys (parE-geeni)	Sekvenssi (5'-3')
1/51	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGGTAACGAAATAGATGTAACAA
2/52	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGAAGATAATGGACGTGGTATGC
3/53	<i>Staphylococcus aureus</i>	GTAACCGACAGTCGAAGTTATC
4/54	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAACTGATAAACGGGGATTACATC
5/55	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGACAAGGCGGCTATAAAACTTC
6/56	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TGGAGATGATATTAAGGTTGTTA
7/57	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTCAGTGTGGCAGATAGCGGACG
8/58	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GGATTCCCACCGTTCAAGTTATT
9/59	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CAACAGATGCTACGGGATTGCAC
10/60	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GGTCAGGGTGGCTACAAAACGTC

11/61	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TGGTGATCGTATTGATGTAAC
12/62	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CTAACGGTTCAAGACCATGGAC
13/63	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GAATTCCAACGTGGTACATTC
14/64	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CGACCGATGGCGCTGGCTTCAT
15/65	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GGTCAAGGTGGCTATAAGACATC
16/66	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TGCTAACTATTGCCGTTGTT
17/67	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATAACTGTTAGTGACAACGGTCG
18/68	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AGATTCTACGATTGACACCGTC
19/69	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	GATAACGATTCTATAAGATTGC

Esimerkki 4. Näyte-DNA:n monistus

Näyte-DNA:t bakteeriviljelmistä tai kliinisistä näytteistä monistettiin seuraavassa esitetyä yleistä menetelmää käyttäen.

- 5 Analysoitavasta näytteestä (bakteeriviljelmä tai kliininen näyte) eristetään DNA käyttäen QIAamp DNA Mini-kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, monistetaan halutulta DNA-alueelta hybridisaatioon käytettävä kohdejuoste epäsymmetristä polymeraseketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteistä 10 eristetty DNA, esimerkissä 1 valmistetut universaalit gB1F- ja gB2R-alukeseokset sekä monistukseen tarvittavat muut komponentit keskenään.

- 15 PCR:ssä 25 µl:n reaktioseos sisältää 32 pmol gB2r-alukeseosta, 8 pmol gB1F-alukeseosta, 200 µM kutakin dATP, dGTP ja dTTP sekä 140 µM dCTP (Sigma, USA), 1 x Hot Start Taq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon lisätty MgCl₂:a siten, että lopullinen konsertraatio on 2,8 mM, 25 nmol Cy5-AP3-dCTP:tä (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 7,5 % DMSO:ta (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 µl eristettyä DNA:ta.

- 20 PCR-reaktio suoritetaan GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems, Yhdysvallat). PCR-laitteessa käytetty lämpöohjelma oli seuraavanlainen: 15 min alkudenturaatio lämpötilassa 95 °C, 40 sylilä 1 min lämpötilassa 95 °C, 1 min lämpötilassa 50 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C, sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geelieletroforesilla 2-%:isessa 25 agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia. Tämän jälkeen Cy5-leimattu PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet,

nukleotidit, puskuri ja polymeraasientsyymi QIAquick-PCR-puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa).

Esimerkki 5. Näytesirujen valmistus ja toiminta

- Esimerkissä 3 valmistetut 5'-päästään aminoidut oligonukleotidi-
 5 koettimet liuotettiin 400 mM natriumkarbonattipuskuriin (pH 9,0) siten, että lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 50 µM. Koettimet kiinnitettiin kovalenttisesti aminosilaanilla päälystetyille mikroskooppilaseille (Genorama, Asper Biotech Ltd., Eesti). Koettimien siirtäminen laseille tehtiin tästä tarkoitusta varten kehitetyllä robotilla (OmniGrid, GeneMachines, USA) ja neuloilla (Telechem SMP3, USA).
 10 Yhden printatun koetinalueen keskimääräinen koko oli 120 µm. Laseille printattiin lisäksi positiivisiksi kontolleiksi 5'-päästä aminoidut PCR-alukkeet. Printauksen jälkeen koetinlaseja pidettiin tunnin ajan ammoniakkihöyryssä koettimen kiinnittämiseksi lasille. Ammoniakkikäsittelyn jälkeen lasit huuhdeltiin kolmeen kertaan tislatussa vedessä ja niiden annettiin kuivua.

- 15 Seuraavaksi esimerkissä 4 valmistettu Cy5-leimattu kohdejuoste hybridisoitiin mikroskooppilasille, johon koettimet oli kiinnitetty. Hybridisaatio-reaktioseos sisälsi n. 200 - 300 ng kohdejuostetta, 20 x SSC:ta (1 µl 20xSSC sisältää 175,3 g NaCl:a ja 88,2 g natriumsitraattia, pH säädetään 7,0 HCl:lla; lopullinen konsentraatio 3,4x), 20 % natriumsodekyylisulfaattia (SDS) (lopullinen konsentraatio 0,3 %) ja steriliä vettä siten, että hybridisaatioreaktioeksen tilavuudeksi saatiin 37 µl. Hybridisaatio aloitettiin denaturaatiolla lämpötilassa 95 °C 3 min. Tämän jälkeen putket jäähdytettiin nopeasti jäillä. Kun seos oli jäähtynyt, se pipetoitiin koetinlasille ja peitettiin peitinlasilla. Koetinlasi asetettiin hybridisaatiokasettiin (ArrayIt, TeleChem International, USA) sisälle ja kasetti suljettiin tiiviisti. Kasetti upotettiin vesihauteeseen, jonka lämpötila oli 57 °C ja laseja hybridisoitiin 12 -16 tuntia.

- 30 Hybridisaation jälkeen hybridisoimattomat tuotteet pestiin pois lasilta seuraavasti: 5 min lämpötilassa 57 °C 0,1-%:isella SDS:llä vedessä, 5 min huoneenlämmössä 01-%:isella SDS:llä 0,5 x SSC:ssä ja 5 min huoneenlämmössä 0,06 x SSC:llä.

- Kun lasit olivat kuivuneet, ne analysoitiin lukijalaitteella (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent, USA). Jos Cy5-leimattu kohdejuoste oli sitoutunut yhteen tai useampaan lasilla olevaan koettimeen, näiden koetintäplien kohdalla nähtiin fluoresoiva signaali. Koska koetinlasit sisälsivät myös positiivisen kontrollin, saatiin hybridisaation toimivuuden varmistava fluoresoiva signaali, vaikka näyte ei olisikaan sisältänyt bakteria.

Kuviossa 2 on esitetty esimerkki hybridisaatiosta. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *Staphylococcus aureus* -puhdasviljelmästä eristetyn DNA:n *gyrB* monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasi sisälsi neljä *Staphylococcus aureus* bakteerille spesifistä *gyrB*-aluketta (taulukko 5 4B: alukkeet 22 - 25), jotka kaikki sitoivat spesifisesti *Staphylococcus aureus* -kohdejuostetta. Signaalin antoivat lisäksi positiiviset kontrollit, joita oli yhteensä 5 kpl.

Esimerkki 6. Potilasnäytteiden analysointi

Klinisistä näytteistä, jotka oli saatu hengitystieinfektiosta kärsiviltä 10 potilailta, eristettiin ja monistettiin DNA esimerkissä 4 kuvatulla tavalla ja testattiin käyttäen esimerkissä 5 kuvattua koetinlasia, johon oli kiinnitetty taulukoissa 4A ja 4B luetellut koettimet sekä positiivisina kontolleina toimivat PCR-alukkeet.

Samat näytteet analysoitiin yleis-bakteeri-PCR:ään pohjautuvalla 15 menetelmällä oleellisesti kuten Nikkari *et al.* (Emerging Infectious Diseases, vol 8, nro 2, 2002, s.188 - 194) ja Kotilainen *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, vol 36, nro 8, 1998, s. 2205 - 2209) ovat kuvanneet. Yleis-bakteeri-PCR-menetelmässä alukkeina käytettiin universaaleja 16S rRNA -geenialueelle sijoittuvia alukkeita, jotka edellä mainituissa julkaisuissa on nimetty fD1mod- ja 20 16S1RR-B-nimisiksi. PCR-tuote kloonattiin ja sekvensoitettiin. Saatua DNA-sekvenssiä verrattiin sekvenssitetokantoihin (GenBank) ja bakteeri tunnistettiin vertailun perusteella. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukosta 5 käy ilmi, että keksinnön mukaisella menetelmällä saatut tulokset ovat täysin identtiset tunnetun tekniikan mukaiseen yleis-bakteeri-PCR-menetelmään verrattuna. Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä 25 on kuitenkin oleellisesti nopeampi suorittaa, sillä tulos saadaan noin vuorokaudessa. Sen sijaan yleis-bakteeri-PCR:n suorittamiseen kuluu aikaa keskimäärin noin viikko kloonaamiseen ja sekvensointiin tarvittavien aikaa vaativien työvaiheiden takia. Verrattuna viljelyyn sekä keksinnön mukainen menetelmä että 30 yleis-bakteeri-PCR osoittautuvat yhtä herkiksi ja muutamassa tapauksessa jopa viljelyä herkemmiksi menetelmiksi.

Taulukko 5. Potilasnäytteillä suoritettu menetelmävertailu.

Kliininen ku-va	Näyte	Viljelytulos	Yleis-bakteeri-PCR	Keksinnön menetelmä
Nielurista-tulehdus	Kudospala	ei tiedossa	F.N.	F.N.
Keuhkokume 1)	Yskös	ei viljelty	ei tiedossa	S.P.
Välkorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I. ja M.C.	H.I. ja M.C.
Välkorva-tulehdus	Märkänäyte	S.P.	S.P.	S.P.
Välkorva-tulehdus	Märkänäyte	negatiivinen	H.I.	H.I.
Välkorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I.	H.I.
Välkorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I., S.P.	H.I., M.C. ja S.P.	H.I., M.C. ja S.P.
Poskiontelo-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I.	H.I.
Poskiontelo-tulehdus	Märkänäyte	negatiivinen	H.I.	H.I.

F.N. = Fusobacterium necrophorum

5 *S.P. = Streptococcus pneumoniae*

H.I. = Haemophilus influenzae

M.C. = Moraxella catarrhalis

- 1) Keuhkokumepotilaasta ei tehty bakteeriviljelyä eikä yleis-bakteeri-PCR:ää, mutta eksinnön mukaisella menetelmällä saatu tulos *Streptococcus pneumoniae*-bakteerista sopii hyvin yhteen kliinisen kuvan kanssa, sillä kyseinen bakteeri on yksi yleisimmistä keuhkokuumeen aiheuttajista.
- 10

Esimerkki 7. Keksinnön mukaisen menetelmän vertailu tunnetun tekniikan mukaiseen, spesifisiä oligonukleotideja hyväksi käyttävään menetelmään

Monien bakteeripatoogenien tunnistusta häiritsevät normaaliflooran 5 bakteerit. Näiden bakteerien olemassaolo on välttämätön terveelle elimistölle ja on arvioitu, että ihmisen normaaliflooraan kuuluu satoja erilaisia baktereja. Normaaliflooran bakteerit voivat monessa tapauksessa häiritä myös bakteridiagnostiikkaa.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän, jossa käytetään 10 spesifisiä *gyrB/parE*-oligonukleotidikoettimia, spesifisyyttä normaaliflooran suhteen tutkittiin ja samalla verrattiin multiplex-PCR-menetelmään, jossa monistamiseen käytetään universaalien ja bakterilajispesifisten alukkeiden seosta.

Normaaliflooran bakterilajien *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Moraxella caviae* ja *Moraxella cuniculi* bakteripuhdasviljelmistä eristettiin ja monistettiin DNA esimerkissä 4 kuvatulla tavalla ja testattiin käytäen esimerkissä 5 kuvattua koetinlasia, johon oli kiinnitetty spesifiset koettimet (esitetty taulukoissa 4A ja 4B). Vertailun vuoksi syntetisoitiin julkaisussa Hendolin et al. (Journal of Clinical Microbiology, 35; 11, 1997) kuvatut spesifiset PCR-alukkeet ja multiplex-PCR suoritettiin julkaisussa kuvatulla tavalla. Tunnetussa 20 multiplex-PCR-menetelmässä toisena PCR-alukkeena käytetään universalia 16S-rRNA:n konservoituneelle geenialueelle sijoittuvaa aluketta ja toisena PCR-alukkeena alukeseosta, joka koostuu neljälle eri bakterilajille spesifisistä alukkeista. Bakterilajit, joita kyseisellä alukeparilla pyrittiin diagnostoimaan, olivat *Alloiococcus otitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ja 25 *Streptococcus pneumoniae*. Bakterilajispesifiset alukkeet oli suunniteltu siten, että syntyvä PCR-tuote on eripitoinen riippuen siitä, mistä bakterilajista se on peräisin. Tulokset esitetty taulukossa 6.

Tulokset osoittavat, että esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä, jossa käytetään spesifisiä oligonukleotidikoettimia, tunnistaa spesifisesti 30 vain halutut bakterit. Sen sijaan tunnetun tekniikan mukaiset, spesifisiksi mainitut alukkeet ja multiplex-PCR-menetelmä ei eroa haluttuja baktereja tutkituista normaaliflooran baktereista, eivätkä ne siis ole halutun spesifisiä (kuvio 3).

Taulukko 6 Keksinnön mukaisen menetelmän ja multiplex-PCR-menetelmän vertailu

Bakteerilaji	*) Koettimet, joihin sitoutumista tapahtui (spesifisyys)	Multiplex-PCR-tulos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4B: 10 - 14 (<i>Strep.pneu</i>) 4A: 1 - 4 (<i>Strep.pneu</i>)	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4B: 5 - 9 (<i>Strep.pyo</i>) 4A: 5 - 7 (<i>Strep. pyo</i>)	Ei monistunut <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus oralis</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus mitis</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4A: 39 - 42 (<i>Morax. catarr</i>)	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella cuniculi</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella caviae</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4A: 30 - 33 (<i>Neisseria gon.</i>)	Ei monistunut <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla

5 *) 4A tarkoittaa taulukkoa 4A ja 4B taulukkoa 4B. Numerot (esim. 10 - 14) viittavat oligonukleotidien numeroihin edellä mainituissa taulukoissa. Spesifisyys ilmaisee mille bakteerilajille kyseiset oligonukleotidikoettimet on suunniteltu.

Patenttivaatimukset

1. Oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita, erityisesti hengitystieinfektiota, aiheuttavien bakteerien topoisomeraaseja, erityisesti 5 GyrB- ja/tai ParE-proteiineja, koodaavien geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevan hypervarioivan alueen sekvenssin kanssa ja joka on bakteerilajispesifinen.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että mainittu hypervarioiva alue on bakteerin *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* ja *Fusobacterium necrophorum* gyraasia tai parE-proteiinia koodaavan geenin hypervarioivan alueen sekvenssi.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että sen pituus on 15 - 30, edullisemmin 20 - 30 ja edullisimmin 21 - 25 nukleiinihappoa.
- 20 4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää jonkin sekvensseistä sekvenssi-tunnusnumerot 1 - 69 mukaisen sekvenssin tai sen kanssa käänteisen ja komplementaarisen sekvenssin tai näiden toiminnallisen fragmentin.
- 25 5. Oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa yhdistelmän sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69.
- 30 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki sekvensseille, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, käänteiset ja komplementaariset sekvenssit.
8. Jonkin patenttivaatimuksista 5 - 7 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että mainittu koetinseos on kiinnitetty kiinteälle kantajalle, edullisesti käsitellylle lasille.
- 35 9. DNA-alukeseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat hengitystieinfektiota aiheuttavien bakteerien topoisome-

raaseja koodaavien, erityisesti GyrB- ja/tai ParE-proteiinia koodaavien geenien, konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsitävät sekvenssit tunnusnumerot 76 ja 77 mukaiset sekvenssit tai niiden kanssa komplementaariset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit.

5 10. Diagnostinen menetelmä hengitystieinfektioita aiheuttavan bakteerin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliinisestä näytteestä, t u n n e t t u siitä, että

a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen patenttivaatimuksessa 9 määriteltyä alukeseosta,

10 b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa missä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 määriteltyjä oligonukleotidi-koettimia hybridisaatio-olosuhteissa ja

c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeraasiketjureaktiota käyttäen ja että vaiheessa b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakterilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

20 12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetyn DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidia todettavissa olevan kohdejuosten aikaansaamiseksi.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki keksinnön mukaiset lajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, tai niiden käänneiset ja komplementaariset sekvenssit.

30 14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty keksinnön mukaiset tietylle tai muutamalle hengitystieinfektioita aiheuttavalle bakteerille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on taulukoissa 4A ja 4B annetut vastaavat sekvenssitunnusnumerot, tai niiden komplementaariset sekvenssit.

15. Jonkin patenttivaatimuksen 10 - 14 mukainen menetelmä, tunnettua siitä, että vaiheessa c) käytetään mikrosirutekniikkaa.

16. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisten oligonukleotidi-koetinsekvenssien tai jonkin patenttivaatimuksista 5 - 8 mukaisen oligonukle-5 otidikoetinseoksen käyttö bakteerien toteamiseen, tunnistamiseen tai luokitte-
luun.

17. Topoisomeraasigeenien konservoitujen alueiden sekvenssien ja konservoituneiden alueiden sekvenssien käyttö bakteridiagnostikassa alkuk-keina tai hybridisaatiokoettimina.

Tiivistelmä

Keksintö koskee nukleiinhappokoettimia ja universaaleja alukkeita, jotka ovat käytökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnostismissä. Erityisesti eksintö koskee spesifisiä nukleiinhappokoettimia, jotka ovat peräisin infektioita aiheuttavien bakteerien topoisomeraasigeenin konservoituneiden alueiden läheiltä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin topoisomeraasigeenin konservoituneilta alueilta. Lisäksi eksintö koskee näiden nukleiinhappokoettimien ja universaalien alukkeiden käytöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnostiin sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinhappokoettimia ja universaaleja alukkeita.

Kuvio 1.

A. *Haemophilus influenzae* *gyrB*-monistustuote ja koettimien sijainti.

5' -cgtcctggatgtatatcggcgataaccgatqacggtacgtactggttgcacc
atatggtatttgaagtggggataatgccattgatgaaggccctcgctggcc
attgtccgatattatcgtacacaattcacgatgataattctgtatcggtgcaa

18

gatgatggggcgggattcctgtggatattcatcctgaagaaggcgttct

19

gcagcagaagttattatgactgtgtctcatcgcaggcggtaaaattgacga

20

aactcttataaagtatcgggcggttacacggcgtggg-3'

B. *Moraxella catarrhaliksen* *gyrB*-monistustuote ja koettimien sijainti.

5' -cgaccaggatgtatatgggtgataaccgatgatggtacaggcttgca

ccatatggtgtttgaggtggatatgccattgatgaggcattggcaggtc
actgtatgagattaatattatcgccatgacgatgaatctgtttcggtatg

43

gagtatggcgtggtatccctgtggatatccaccctgaagaagggtgtatc

42

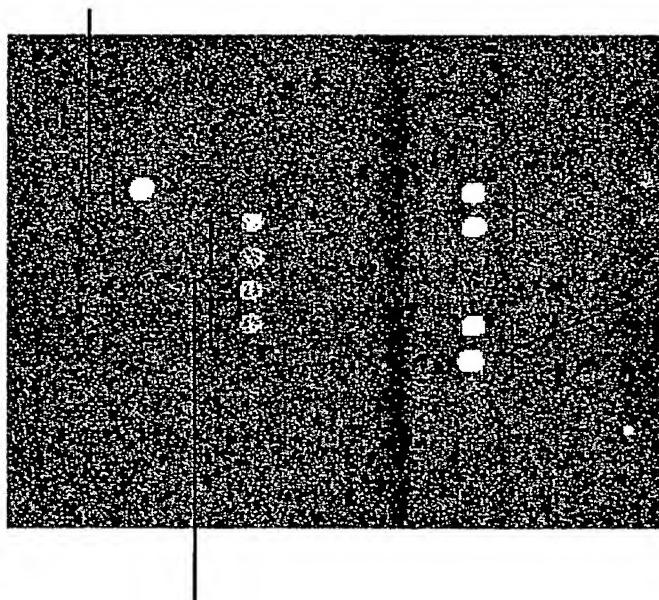
agctgccgaggattattatgacggtgcttcatgcaggcggtaaaattgatgat

40

aattcatacaaagtatctggggcctgcacggcgtagg-3'

Kuvio 2

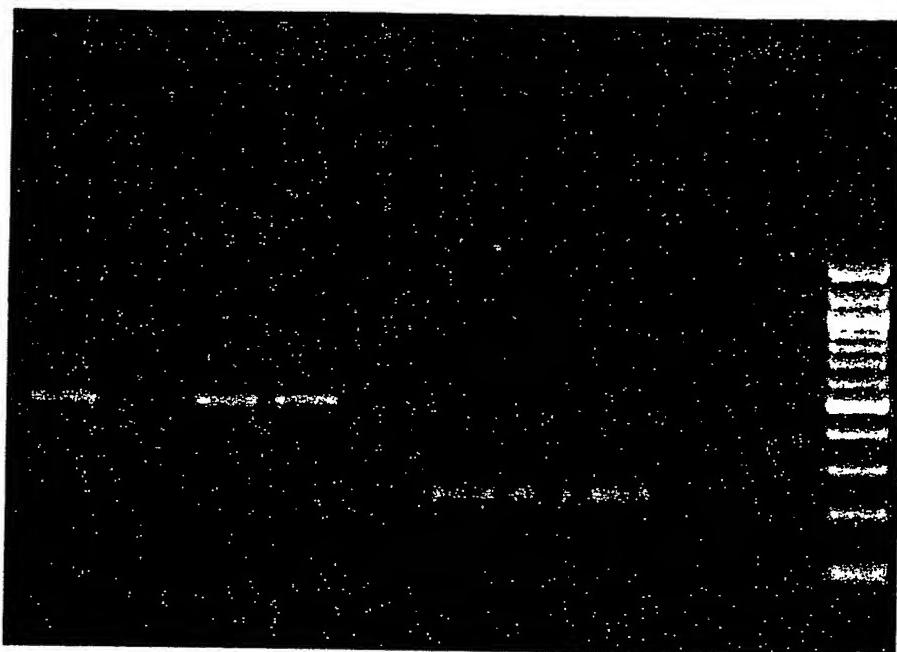
Positiivinen kontrolli



> Positiiviset kontrollit

Staphylococcus aureus -positiiviset *gyrB*-
oligonukleotidit (4 kpl, taulukko 4B: oligonukleotidit 21 - 24).

Kuvio 3



1. *Streptococcus pneumoniae*
2. *Streptococcus pyogenes*
3. *Streptococcus oralis*
4. *Streptococcus mitis*
5. Negatiivinen kontrolli
6. *Moraxella catarrhalis*
7. *Moraxella cuniculi*
8. *Moraxella caviae*
9. *Neisseria gonorrhoeae*
10. Negatiivinen kontrolli
11. Kokomarkkeri

2022264.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> MoBiDiag Oy

<120> Nukleainihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa nii tää käytetään

<130> 2022264FI

<160> 77

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

ctcaaaagaa ggtcttcacc atc

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

gccatattca agtttttatt gag

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

agccagatga ttcgattact gtt

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

ttgagaccgt ctttacagtc ctt

23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

gtttgcctc tcataattaaa gtc

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 6

tctttattga agcagataat tcc

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 7

cgttgaaca gtttttacag tct

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

2022264.ST25.txt

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 8
ggtcttcatc atctagtc ta tga

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 9
ggtttagac wacagcattg acg

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 10
agccatggca gtttattgt cta

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 11
ggattgtatgt tsgcattttt a g

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 12
gggtattgtc wtctgtata atg

23

2022264.ST25.txt

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 13
ttattgctct aggattgatg tt

22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 14
gcattttaga gsacgggggt att

23

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 15
tcaaactaac ccttaaagac aact

24

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 16
tgaaacagtg tttacggtag tcc

23

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Haemophilus influenzae

2022264.ST25.txt

<400> 17
atgataattc tgtatcggtg caa 23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 18
agcagaagg ttatgactg tgc 23

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 19
gacgataact cttataaaagt atc 23

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 20
gataccgatg acggtaactgg tttg 24

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 21
agtgtggaa attgtcgata ata 23

<210> 22

2022264.ST25.txt

<211> 25

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 22

tgaagttgtt attgaaaaag ataac

25

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 23

ggattaaagt aacggataac gga

23

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 24

ctgtcgaagt tatttaact gttt

24

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 25

cgacttcaga gagaggttg cac

23

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

2022264.ST25.txt

<400> 26
gaaatcagca tcaccatcca tac 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 27
atacggatga gtcgatcact gtc 23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 28
gacgacaaca cctacaagg tgc 23

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 29
gacaccgacg atggcaccgg tctg 24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 30
ttcgacaaca acagctacaa aat 23

<210> 31

<211> 23

2022264.ST25.txt

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 31

atatgggttt tgaagtattt gac

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 32

gacaataatca cggtaacgtt aca

23

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 33

gacaacaaca gctacaaaat ctc

23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 34

tattcgagggt ggttagataac gct

23

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 35

ttcacggcga taactctgtc tct

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 36

cggccataaac tctgtctctg tac

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 37

gacgataact cctataaaagt gtc

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 38

gacacggatg acggcacccgg tctg

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 39

agctgccgag gttattatga cg

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

2022264.ST25.txt

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 40
gatgataatt catacaaagt atc

23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 41
tgtggatatc caccctgaag aag

23

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 42
ataccgatga tggcacaggc ttg

23

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 43
gatgataatt cctacaaggt atc

23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 44
agcagccgaa gtcatcatga cag

23

2022264.ST25.txt

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 45

tgttagatatt cataaaagaag aag

23

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 46

atacagatga tggaaccggc ttg

23

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 47

cagatgatgg aaccggtttg cat

23

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 48

caacatcagc caggggattta cat

23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Fusobacterium necrophorum

2022264.ST25.txt

<400> 49
ggaattccag tagacataca tcc

23

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 50
tgaaaatgat aactataaaag tgtc

24

<210> 51

<211> 23

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 51
cggttaacgaa atagatgtaa caa

23

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 52
agaagataat ggacgtggta tgc

23

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 53
gtaaaccgac agtcgaagtt atc

23

<210> 54

2022264.ST25.txt

<211> 24
<212> DNA
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 54
caactgataa acggggattt catc

24

<210> 55
<211> 23
<212> DNA
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 55
ggacaaggcg gctataaaac ttc

23

<210> 56
<211> 23
<212> DNA
<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 56
tggagatgtt attaaggttt tta

23

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 57
gtcagtgtgg cagatagcgg acg

23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> *Streptococcus pyogenes*

2022264.ST25.txt

<400> 58
ggattccac cgttcaagtt att 23

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 59
caacagatgc tacgggattg cac 23

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 60
ggtcagggtg gctacaaaac gtc 23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 61
tggtgatcgt attgatgtaa cta 23

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 62
ctaacggttc aagaccatgg acg 23

<210> 63

<211> 23

2022264.ST25.txt

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 63

gaattccaac tgttgaggtt atc

23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 64

cgaccgatgg cgctggtcctt cat

23

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 65

ggtcaaggtg gctataagac atc

23

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 66

tgctaatact attgccgttg ttt

23

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 67

ataactgtta gtgacaacgg tcg

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

* <400> 68

agatttctac gattgacacc gtc

23

<210> 69

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 69

gataacgatt cttataagat tgc

23

<210> 70

<211> 294

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 70

cgaccaggga tgtatattgg tgataccgat gatggcacag gcttgacca tatgggttt 60

gaggtggtgg ataatgccat tgatgaggca ttggcaggc actgtgatga gattaatatt 120

atcgccatg acgatgaatc tgttcggtg atggactatg ggctgttatc tcctgtggat 180

atccacccctg aagaagggtgt atcagctgcc gaggttatta tgacggtgct tcattgcaggc 240

ggtaaatttg atgataattc atacaaagta tctgggggcc tgcacggcgt agga 294

<210> 71

<211> 257

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 71

2022264.ST25.txt

ggggatacag atgatggAAC cggttgcAT cacatggTTT ttgaggTTT agataattca	60
atagatgAGT ctctggcAGG atattgcaAG gaaatttttG ttaccatcca tagcgatgag	120
tcaattacag ttaaggacga tggccgtggT attcctgtAG atattcataa agaagaaggc	180
aaatcagcag ccgaagtcat catgacagtc ctacatgctg gaggtaaatt tgatgataat	240
tcctacaagg tatctgg	257

<210> 72

<211> 290

<212> DNA

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 72

cgcCcaggGA tgtacatCGG aacaacatCA gCcaggGGAT tacatcATTt agtatggAA	60
gtggtagATA attctgtggA tgaAGCATTt gctgggtATT gtaataggAT tactgtAAgt	120
atTTTgcCTg ataacATTat tcaAGTAGAG gataatggAA gaggaATTCC agtagACATA	180
catccAAAAT atggAAAATC cgcttggAA attgtATTGA cggTATTACA tgctggggGA	240
aaatttgAAA atgataACTA taaAGTGTCA ggtggACTGC acggAGTTGG	290

<210> 73

<211> 291

<212> DNA

<213> *Streptococcus mitis*

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, t, c, or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (288)..(288)

<223> n is a, t, c, or g

<400> 73

2022264.ST25.txt

agtcccgaaa	tgtacatngg	gtcaacttca	aaagaaggta	ttcaccatct	agtctggaa	60
attgttgata	actcaattga	cgagggcttg	gcaggatttg	ctagccatat	tcaagtcttt	120
attgagccag	ataattcgat	tacagttgtt	gatgatggac	gtggtatccc	agtcgatatt	180
cagaaaaaaa	caggtcgacc	tgccgttgag	actgtctta	ctgttcttca	cgctggagga	240
aagttggcg	gtggcggata	taaggtctca	gacggtcttc	atggcgtnnn	a	291

<210> 74

<211> 288

<212> DNA

<213> *Streptococcus oralis*

<400> 74

agaccggggaa	tgtatattgg	atcgaccgac	ggtgctggtc	tccatcatct	agtctggaa	60
atcgtggata	atgcgggttga	cgaagccttg	tctggatttg	gtgatcgcat	cgatgtgacg	120
attaataagg	acgggagttt	aacggttcaa	gaccacggac	gtgggatgcc	aacgggaatg	180
cacgccccatgg	gaattccaac	tgttgaagtt	atctttacca	ttctccacgc	tggagggaaa	240
ttcggtcaag	gtggctataaa	gacatctgg	ggtctgcac	gggttggaa		288

<210> 75

<211> 294

<212> DNA

<213> *Haemophilus parainfluenzae*

<400> 75

agaccggggaa	tgtatatcgg	ggataaccat	gatggAACAG	gcctacacca	tatgggtttt	60
gaggtgggtgg	ataacgctat	cgatgaagcg	cttgctggct	attgttccga	tattatcgtc	120
actattcatg	atgataattc	tgttccgtt	caagatgacg	gccgcggtat	tccggtagat	180
attcacccag	aagaaggggt	ttctgcggca	gaagcaatca	tgacagtact	tcacgcaggt	240
ggtaaattcg	atgataactc	ttataaagta	tcagggggac	tacacggcgt	tggaa	294

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2022264.ST25.txt

<220>
<223> primer
<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> w is a or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> k is g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> y is c or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> h is a, c or t

<400> 76
cgtccwggka tgtayathgg

20

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<220>

2022264.ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> h is a, c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> r is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> r is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> d is a, g or t

<400> 77
cchacrcrcrt gwaawcccdcc

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.